



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 17 098 B4 2004.04.15

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 102 17 098.3
(22) Anmeldetag: 17.04.2002
(43) Offenlegungstag: 06.11.2003
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 15.04.2004

(51) Int Cl.⁷: G02B 21/06
G01N 21/64

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

(74) Vertreter:
Dr. Werner Geyer, Klaus Fehners & Partner GbR,
80687 München

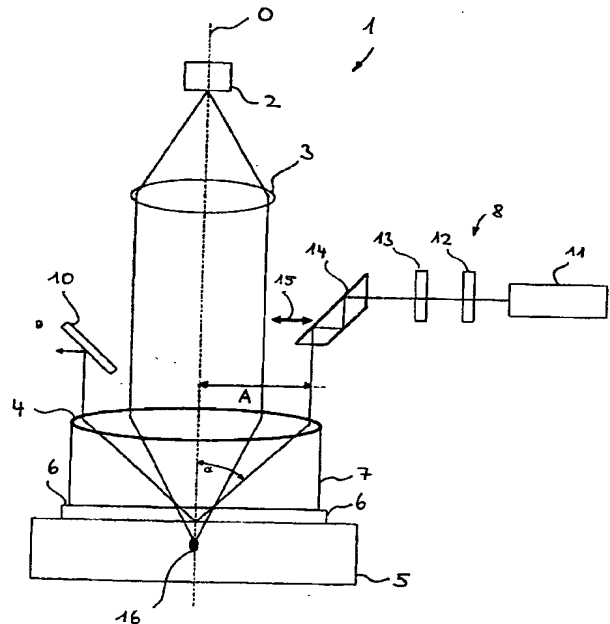
(72) Erfinder:
Danz, Rainer, 37085 Göttingen, DE; Brocksch,
Dieter, Dr., 89081 Ulm, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 689 12 343 T2
US 59 43 129
JP 09-2 29 861 A

(54) Bezeichnung: **Auflicht-Beleuchtungsanordnung für ein Mikroskop**

(57) Hauptanspruch: Auflicht-Beleuchtungsanordnung für ein Mikroskop (1) mit einer optischen Achse (0) aufweisenden Objektiv (4), wobei die Beleuchtungsanordnung aufweist:

- eine Beleuchtungsquelle (11), die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlbündel (9) abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse (0) propagiert, und
- eine Umlenkeinrichtung (14), die das Beleuchtungsstrahlbündel (9) umlenkt und parallel zur optischen Achse (0) in das Objektiv (4) einkoppelt, dadurch gekennzeichnet, daß
- das von der Beleuchtungsquelle (11) abgegebene Beleuchtungsstrahlbündel (9) s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer konstanten Phasendifferenz $d = n \cdot 60^\circ$ aufweist, wobei n eine ganze Zahl ist, und
- die Umlenkeinrichtung (14) das Beleuchtungsstrahlbündel x -mal oder ein ganzzahliges Vielfaches davon reflektiert, wobei $x = ((n + 1) \cdot 180^\circ - d) / 60^\circ$ gilt, so daß linear polarisiertes Licht in das Objektiv (4) fällt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf eine Auflicht-Beleuchtungsanordnung für ein Mikroskop mit einem eine optische Achse aufweisenden Objektiv, die aufweist: eine Beleuchtungsquelle, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert, und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das Objektiv einkoppelt.

[0002] Solche Auflicht-Beleuchtungsanordnungen sind insbesondere bei der sogenannten Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (auch TIRF-Mikroskopie bezeichnet) im Einsatz, wenn die Beleuchtungstrahlung unter definierten Winkelbedingungen auf eine Probe fallen muß.

[0003] Bei der TIRF-Mikroskopie wird eine hohe axiale Auflösung erreicht, indem Beleuchtungsstrahlung so eingestrahlt wird, daß an der Probenoberfläche Totalreflexion auftritt. Dadurch wird eingestrahlte Leistung nur als evaneszente Welle ins optisch dünnere Probenmedium eingebracht. Dabei werden grenzflächennahe Moleküle zur Fluoreszenz angeregt. Die Anregungsintensität fällt exponentiell mit dem Abstand von der Grenzfläche ab, so daß die Eindringtiefe der Anregung auf eine Größenordnung von maximal 200 nm begrenzt werden kann. Da die Eindringtiefe weiter durch den Einfallswinkel des Lichtes auf die Grenzfläche variiert werden kann, erhält man eine sensible und sehr hoch auflösende Tiefensonde für die Erforschung von Geometrie oder Biodynamik von Zellen, Membranen und anderen Grenzflächen.

Stand der Technik

[0004] Die TIRF-Mikroskopie, wie sie beispielsweise in der Veröffentlichung Axelrod, D.: "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflexion fluorescence", J. Cell Biol. 89 (1981) 141-145, beschrieben ist, ist somit auf unter einem großen Winkel auf die Grenzfläche von Objektträger und Probe einfallende Strahlung angewiesen. Die gattungsbildende Veröffentlichung Axelrod, D., Journal of Biomedical Optics, 6, 2001, schlägt dazu vor, einen Laser als Beleuchtungsquelle einzusetzen, dessen Strahlung über ein Planglas in das Mikroskop-Objektiv einkoppelt wird. Mit Hilfe einer geeignet angeordneten Schiebelinse kann dann der Winkel der Totalreflexion eingestellt werden. Da der dingseitige Brennpunkt der Schiebelinse mit dem dingseitigen Brennpunkt des Objektivs zusammenfällt, gelangt, wie erwünscht, paralleles Licht zur Totalreflexion. Die Effizienz ist allerdings durch mangelhafte Polarisation der auf die Probe fallenden Strahlung verbesserungswürdig.

[0005] Die DE 689 12 343 T2 beschreibt eine Auflicht-Beleuchtungsanordnung für ein TIRF-Mikroskop mit einstellbarem Einfallswinkel. Die JP 09229861 A schildert ein Fluoreszenzmikroskop mit elliptisch pola-

risiertem Beleuchtungslicht, bei dem die Phasendifferenz zwischen der s- und p-Polarisation einstellbar ist, und die US 59 43 129 betrifft ein Fluoreszenzmikroskop mit linear polarisiertem Auflicht-Beleuchtungslicht, bei dem das Fluoreszenzlicht hinsichtlich seiner Orthogonalkomponente registriert wird.

Aufgabenstellung

[0006] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Auflicht-Beleuchtungsanordnung der eingangs genannten Art soweit zu bilden, daß eine hocheffiziente Anregung erreicht wird.

[0007] Diese Aufgabe wird bei einer Auflicht-Beleuchtungsanordnung der eingangs genannten Art dadurch gelöst, daß das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer konstanten Phasendifferenz $d = n \cdot 60^\circ$ aufweist, wobei n eine ganze Zahl ist, und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlbündel x -mal oder ein ganzzahliges Vielfaches davon reflektiert, wobei $x = ((n + 1) \cdot 180^\circ - d) / 60^\circ$ gilt, so daß linear polarisiertes Licht in das Objektiv fällt.

[0008] Die erfindungsgemäße Beleuchtungsanordnung koppelt die Eigenschaften der Beleuchtungsquelle hinsichtlich der Polarisation des abgegebenen Lichtes und die Eigenschaften der Umlenkeinrichtung so, daß im Endeffekt linear polarisiertes Licht über das Objektiv auf die Probe fällt. Gibt die Beleuchtungsquelle, beispielsweise ein Laser, linear polarisierte Strahlung ab, bei der bekanntermaßen die Phasendifferenz zwischen s- und p-Polarisationsrichtung Null ist, so sind die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Umlenkeinrichtung so vorgegeben, daß eine dreimalige Reflexion des Beleuchtungsstrahlbündels erfolgt. Da jede Reflexion eine Phasendifferenz von 60° zwischen s- und p-Polarisation zur Folge hat, tritt am Ausgang der Umlenkeinrichtung wieder linear polarisiertes Licht aus. Natürlich kann die Umlenkeinrichtung auch ein Vielfaches von drei Reflexionen ausführen; unter dem Gesichtspunkt möglichst minimaler Lichtabschwächung ist jedoch regelmäßig eine Umlenkeinrichtung mit der geringsten möglichen Anzahl an Reflexionen zu bevorzugen.

[0009] Durch die Umlenkeinrichtung kann die Beleuchtungsquelle in beliebigem Abstand zur optischen Achse des Mikroskopes angeordnet werden, so daß die mitunter beim Stande der Technik anzutreffende bauliche Enge im Bereich der Beleuchtungseinheit nicht auftritt. Insbesondere kann die Umlenkeinrichtung eine 90° -Umlenkung bewirken, so daß die Beleuchtungsquelle bei vertikal verlaufender Mikroskopachse mit einem horizontal verlaufenden Beleuchtungsstrahlbündel ausgebildet werden kann.

[0010] Bei der TIRF-Mikroskopie werden optimale Ergebnisse erreicht, wenn der Aperturwinkel, d.h. der Winkel, unter dem ein Beleuchtungsstrahlbündel auf eine Probe fällt, im wesentlichen dem Grenzwinkel der Totalreflexion an der Probe entspricht. Für solche Anwendungen ist deshalb eine Beleuchtungsanord-

nung anzustreben, mit der der Aperturwinkel verstellt werden kann. Dafür ist eine Weiterbildung der Erfindung zu bevorzugen, bei der die Umlenkeinrichtung das umgelenkte Strahlenbündel in einem Abstand zur optischen Achse in das Objektiv einkoppelt und ein Bauteil mit senkrecht zur optischen Achse verschiebbarer Lage aufweist, wobei der Abstand von der Lage des Bauteils abhängt.

[0011] Bei dieser Weiterbildung hängt der Aperturwinkel vom Abstand von der optischen Achse ab, mit dem ein gering divergierendes Strahlenbündel in das Objektiv eingekoppelt wird. Durch die verschiebbare Lage des Bauteils der Umlenkeinrichtung kann damit auf einfache Weise der Aperturwinkel auf den Grenzwinkel der Totalreflexion gestellt werden. Damit lassen sich die Bedingungen so wählen, daß optimale Einkopplung der Anregungsstrahlung in die zu untersuchende Probe auftritt.

[0012] Das Bauteil der Umlenkeinrichtung, dessen Lage veränderbar ist und den Abstand zur optischen Achse des Objektivs festlegt, kann dabei verschiedenartig ausgestaltet werden. In einer zweckmäßigen Ausführung ist das Bauteil ein reflektierendes Element, das das Beleuchtungsstrahlbündel parallel zur optischen Achse umlenkt. Als reflektierende Elemente sind totalreflektierende Prismen bekannt, die vorteilhafterweise einen besonders hohen Reflexionsgrad aufweisen.

[0013] Bei einer Beleuchtungsquelle, die linear polarisiertes Licht abgibt, ist eine Umlenkeinrichtung vorgesehen, die drei Reflexionen oder Vielfache davon aufweist. Unter dem Gesichtspunkt möglichst geringer Verluste ist es deshalb zu bevorzugen, daß die Beleuchtungsquelle ein linear polarisiertes Licht abgibt und die Umlenkeinrichtung ein Prisma aufweist, das das Beleuchtungsstrahlbündel mittels dreier Totalreflexionen umlenkt. Mit einem solchen Aufbau sind die optischen Verluste in der Umlenkeinrichtung minimiert. Gleichzeitig kann insbesondere bei einem hochparallelen Beleuchtungsstrahlbündel wegen der dann vernachlässigbar kleinen Variationsbreite des Beleuchtungswinkels eine nahezu vollständige Totalreflexion und somit eine hohe Effizienz der Beleuchtungsanordnung erreicht werden.

[0014] Wie bereits erwähnt, sind für Aufbauten, bei denen die Beleuchtungsquelle ein Beleuchtungsstrahlbündel abgibt, das senkrecht zur optischen Achse propagiert, Umlenkeinrichtungen vorgesehen, die eine 90°-Umlenkung vorsehen. Ein besonders einfachen und kompakten Aufbau erhält man dabei, wenn die Umlenkeinrichtung ein Berek-Prisma aufweist. Mit einem solchen Berek-Prisma kann die Einstellung des Abstandes zur optischen Achse durch einfache Verschiebung des Prismas senkrecht zur optischen Achse erreicht werden. Ein Berek-Prisma, das drei Totalreflexionen aufweist, ist mit einer Beleuchtungsstrahlquelle kombiniert, die linear polarisiertes Licht abgibt, z.B. mit einem Laser.

[0015] Ein Berek-Prisma hat dabei zusätzlich den Vorteil, daß die Polarisation auch bei einer gewissen

Variation des Einfallswinkels in das Prisma erhalten bleibt. So zeigte sich bei einer Variation von $\pm 2^\circ$ keine wesentliche Änderung der Polarisation am Ausgang des Prismas. Die Anordnung mit Berek-Prisma ist deshalb besonders unempfindlich gegen Variationen des Winkels, mit dem die Beleuchtungsstrahlquelle Strahlung abgibt. Insbesondere hat der Divergenzwinkel des Beleuchtungsstrahlbündels keine oder vergleichsweise geringe Auswirkungen auf die Polarisierung der Beleuchtungsstrahlung an der Probe. Bei Verwendung eines Berek-Prismas kann also auch stärker divergierende Beleuchtungsstrahlung verwendet werden, und der Justieraufwand sinkt.

[0016] Möchte man einen solchen Laser, der linear polarisiertes Strahlung abgibt, mit einer Umlenkeinrichtung kombinieren, die nicht genau drei Reflexionen ausführt, so muß man die Beleuchtungsquelle so fortbilden, daß sie die entsprechende Phasenverschiebung zwischen s- und p-Polarisationen erzeugt. Für solche Anwendungen ist es bevorzugt, daß die Beleuchtungsquelle einen linear polarisierte Strahlung abgebenden Laser und ein optisches Element zur Einstellung eines Polarisationswinkels aufweist. Ein solches optisches Element kann beispielsweise eine entsprechende Verzögerungsplatte sein, d.h. ein doppelbrechendes Element, das für s- und p-Polarisationsrichtungen unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten längs der optischen Achse aufweist. Auch ist eine Kombination aus Polteilern mit einer geeigneten Verzögerungsleitung möglich.

[0017] Die erfindungsgemäße Beleuchtungsanordnung eignet sich, wie erwähnt, besonders für die TIRF-Mikroskopie. Sie kann dort mit besonderem Vorteil eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße Aufgabe wird deshalb weiter gelöst durch ein TIRF-Mikroskop mit einer Auflicht-Beleuchtungsanordnung mit einem eine optische Achse aufweisenden Objektiv, die eine Beleuchtungsquelle aufweist, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert, und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das Objektiv einkoppelt, wobei das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer konstanten Phasendifferenz $d = n \cdot 60^\circ$ aufweist, wobei n eine ganze Zahl ist, und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlbündel x -mal oder ein ganzzahliges Vielfaches davon reflektiert, wobei $x = ((n + 1) \cdot 180^\circ - d) / 60^\circ$ gilt, so daß linear polarisiertes Licht in das Objektiv fällt.

[0018] Wenn die Beleuchtungsanordnung die Einstellung des Abstandes zur optischen Achse ermöglicht, kann der Aperturwinkel besonders exakt auf den Grenzwinkel der Totalreflexion eingestellt werden. Es ist deshalb ein Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskop zu bevorzugen, bei dem ein Aperturwinkel, unter dem das umgelenkte Beleuchtungsstrahlbündel auf eine Probe fällt durch Einstellung des Abstandes wählbar ist. Mit einem solchen Totalreflexionsflu-

oreszenz-Mikroskop kann optimale Anregung von Fluorophoren in einer Probe erreicht werden.

Ausführungsbeispiel

[0019] Die Erfindung wird nachfolgend beispielhalber unter Bezugnahme auf die Zeichnungen noch näher erläutert. Die einzige Figur der Zeichnung zeigt eine schematische Schnittdarstellung durch ein Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskop mit einer Auflicht-Beleuchtungsanordnung.

[0020] Das in der Figur mit Bezugszeichen 1 versehene Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskop (im folgenden TIRF-Mikroskop) weist einen Empfänger 2 auf, der ein Zwischenbild aufnimmt, welches von einer Tubuslinse 3 erzeugt wird. Der Tubuslinse 3 ist ein Objektiv 4 vorgeordnet, das ein Bild einer Probe 5 aufnimmt. Empfänger 2, Tubuslinse 3 und Objektiv 4 befinden sich auf einer optischen Achse 0.

[0021] Über der Probe 5 liegt ein Deckglas 6, und zwischen Deckglas 6 und Objektiv 4 ist eine Ölimmersion 7 angeordnet.

[0022] Aus einer Beleuchtungsanordnung 8 wird ein Beleuchtungsstrahl 9 in einem Abstand A zur optischen Achse 0 in das Objektiv 4 eingekoppelt, so daß er unter einem Aperturwinkel α auf die Grenzfläche zwischen Probe 5 und Deckglas 6 fällt.

[0023] Das Mikroskop, bei dem es sich beispielsweise um ein Mikroskop des Bautypes Axioplan der Carl Zeiss, Deutschland, handeln kann, erlaubt damit die Einkopplung der Energie aus evaneszenten Wellen in das optisch dünnere Medium der Probe 5, wodurch grenzflächennahe Moleküle zur Fluoreszenz angeregt werden können. Durch den scharfen Abfall der Intensität mit dem Abstand von der Grenzfläche wird trotz einer Wellenlänge zwischen 350 und etwa 700 μm eine deutlich darunter liegende Eindringtiefe erreicht, z.B. 50 bis 200 μm ; die Tiefenauflösung ist also besser, als es die zu verwendende Wellenlänge eigentlich erwarten ließe.

[0024] Es kann somit mit sehr guter Tiefenauflösung ein fluoreszierendes Objekt 16 der Probe 5 mit dem Mikroskop 1 erfaßt werden. Da die Eindringtiefe durch den Einfallswinkel bzw. Aperturwinkel α der Strahlung aus dem Beleuchtungsstrahl 9 auf die Grenzfläche variiert, ist die Beleuchtungsanordnung 8 so ausgebildet, daß der Aperturwinkel α verändert werden kann.

[0025] Das an der Probe 5 total reflektierte Licht wird dann über einen Spiegel 10 wieder ausgekoppelt, so daß die Erfassung des Objektes 16 im Mikroskop 1 nicht durch Falschlicht gestört wird.

[0026] Die Amplitude, mit der sich die inhomogene Welle im optisch dünneren Medium der Probe 5 fortpflanzt bzw. exponentiell abklingt, hängt vom Polarisationszustand des einfallenden Beleuchtungsstrahls 9 ab und hat dann ein Maximum, wenn linear polarisiertes Licht auf die Grenzfläche zwischen dünnerem Medium, d.h. Probe 5, und optisch dichterem Medium, d.h. Deckglas 6, fällt. Die Polarisationsrich-

tung wird dabei experimentell eingestellt.

[0027] Die Beleuchtungsanordnung 8, die den Beleuchtungsstrahl 9 im gewünschten Abstand A zur optischen Achse 0 und mit der erforderlichen Polarisationsrichtung bereitstellt, weist einen Laser 11 auf, der linear polarisiertes Licht emittiert. Dieses passiert eine rotierende Mattscheibe 12, die die Kohärenz des Laserlichts stört.

[0028] Das derart inkohärent gewordene Laserlicht durchläuft dann eine azimuthal drehbare Halbwellenplatte 13, mittels der der Polarisationsazimut einstellbar ist, um das vorerwähnte Maximum erreichen zu können. Das von der derart aufgebauten Beleuchtungsquelle propagierende, linear polarisierte Beleuchtungsstrahlbündel fällt dann in ein Berek-Prisma 14, in dem es drei inneren Totalreflexionen unterworfen und dabei insgesamt um 90° , d.h. nunmehr parallel zur optischen Achse 0 umgelenkt wird.

[0029] Bei jeder Totalreflexion wird zwischen s- und p-Polarisationsrichtungen eine Phasenverschiebung von 60° bewirkt, so daß an der Austrittsfläche des Prismas wiederum linear polarisiertes Licht parallel zur optischen Achse 0 und im Abstand A dazu austritt.

[0030] Das als Immersionsobjektiv ausgebildete Objektiv 4 bewirkt dann, daß der parallele Beleuchtungsstrahl 9 mit geringer Winkeldifferenz unter einem Aperturwinkel α auf die Probe fällt. Der Aperturwinkel hängt dabei sowohl von der numerischen Apertur des Objektivs 4 als auch von der Brechzahl Ölimmersion 7 sowie der Brechzahl des Deckglases 6 und der optisch dünneren Probe 5 ab.

Patentansprüche

1. Auflicht-Beleuchtungsanordnung für ein Mikroskop (1) mit einem eine optische Achse (0) aufweisenden Objektiv (4), wobei die Beleuchtungsanordnung aufweist:

- eine Beleuchtungsquelle (11), die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlbündel (9) abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse (0) propagiert, und

- eine Umlenkeinrichtung (14), die das Beleuchtungsstrahlbündel (9) umlenkt und parallel zur optischen Achse (0) in das Objektiv (4) eingekoppelt,

dadurch gekennzeichnet, daß

- das von der Beleuchtungsquelle (11) abgegebene Beleuchtungsstrahlbündel (9) s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer konstanten Phasendifferenz $d = n \cdot 60^\circ$ aufweist, wobei n eine ganze Zahl ist, und

- die Umlenkeinrichtung (14) das Beleuchtungsstrahlbündel x-mal oder ein ganzzahliges Vielfaches davon reflektiert, wobei $x = ((n + 1) \cdot 180^\circ - d) / 60^\circ$ gilt, so daß linear polarisiertes Licht in das Objektiv (4) fällt.

2. Beleuchtungsanordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Umlenkeinrichtung (14) das umgelenkte Strahlbündel (9) in einem Ab-

stand (A) zur optischen Achse in das Objektiv (4) ein-koppelt und ein Bauteil mit senkrecht zur optischen Achse (0) verschiebbarer Lage aufweist, wobei der Abstand (A) von der Lage des Bauteils abhängt.

3. Beleuchtungsanordnung nach Anspruch 2, da-durch gekennzeichnet, daß durch Änderung des Ab-standes (A) zur optischen Achse (0) ein Aperturwin- α), unter dem das Beleuchtungsstrahlbündel (9) auf eine Probe (5) fällt, einstellbar ist.

4. Beleuchtungsanordnung nach Anspruch 1,2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuch-tungsquelle (11) linear polarisiertes Licht abgibt und die Umlenkeinrichtung (14) Prisma aufweist, das das Beleuchtungsstrahlbündel (9) mittels dreier Totalref-lexionen umlenkt.

5. Beleuchtungsanordnung nach Anspruch 4, da-durch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungsstrahl-bündel (9) senkrecht zur optischen Achse (0) zur Um-lenkeinrichtung (14) propagiert und die Umlenkein-richtung ein Berek-Prisma aufweist.

6. Beleuchtungsanordnung nach einem der obi-gen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsquelle einen linear polarisierende Strahlung abgebenden Laser (11) und ein optisches Element (13) zur Einstellung eines Polarisationswin-kels aufweist.

7. Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop mit einer Auflichtbeleuchtungsanordnung nach einem der obi-gen Ansprüche.

8. Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop nach An-spruch 7 mit einer Beleuchtungsanordnung nach An-spruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Apertur-winkel, unter dem das umgelenkte Beleuchtungs-strahlbündel (9) auf eine Probe (5) fällt durch Einstel-lung des Abstandes (A) wählbar ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

